

Zur Strukturaufklärung des Centaureins
und über die
Anthoxanthine von Matricaria Chamomilla L.

Krishnakant M. Parikh

1960



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ZUR STRUKTURAUFKLÄRUNG DES CENTAUREINS
UND ÜBER DIE ANTHOXANTHINE VON MATRICARIA CHAMOMILLA L.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Krishnakant M. Parikh

aus

Bombay/Indien

Januar 1960



1. Berichterstatter: Professor Dr. L. Hörhammer
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Bamann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 2. 1960

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung	1
B. Allgemeiner Teil	2
I. Strukturaufklärung von Centaurein	2
1. Isolierung	2
2. Identifizierung	2
a) Orientierende Vorversuche	2
b) Chemische Untersuchungen	4
c) Über die Stellung des Zuckerrestes	6
d) Über die Substitution der OH-Gruppen	11
3. Diskussion der Ergebnisse	14
II. Trennung und Identifizierung der Glykoside von Matricaria Chamomilla L.	15
1. Papierchromatographische Voruntersuchungen	15
2. Isolierung der einzelnen Glykoside	18
3. Auftrennung der Fraktionen	20
4. Identifizierung der einzelnen Glykoside	21
C. Experimenteller Teil	29
1. Papierchromatographie	29
2. Zur Strukturaufklärung des Centaureins	30
a) Drogenmaterial	30
b) Farbreaktionen	30
c) Spezielle experimentelle Befunde	31
d) UV-Spektren	33
e) IR-Spektren	35
3. Isolierung der Flavone von Matricaria Chamomilla L. ...	36
a) Trennung durch Säulenchromatographie	36
b) Auftrennung durch Gegenstromverteilung	37
c) Chromatographie an Polyamid	38
d) Chemisches, physikalisches und papierchromatographi- sches Verhalten der isolierten Glykoside	39
e) IR-Spektren	42
f) UV-Spektren	42

A. Einleitung

Nach Literaturangaben und vor kurzem an unserem Institut durchgeführten Untersuchungen weicht die Familie der Kompositen hinsichtlich der Flavonführung dadurch von anderen Familien ab, dass in ihr sonst sehr selten vorkommende Aurone, Chalkone, Polyhydroxyflavone und deren Methylderivate gebildet werden. Darüber hinaus ist das gehäufte Auftreten von Apigeninglykosiden in verschiedenen Blütenblättern bemerkenswert. Aufmerksam wurde man auf diese Verbindungen, als man fand, dass dem Apigenin selbst eine beträchtliche spasmolytische Wirksamkeit zukommt. Da man sehr bald in der als Spasmolyticum bekannten echten Kamille ein Apigeninglykosid isolierte, brachte man zumindest einen Teil dieser Wirkung mit der des Flavonglykosids in Verbindung.

Aufgabe vorliegender Arbeit war daher die erneute Untersuchung dieser Droge mit dem Ziel, sämtliche anderen Flavonverbindungen zu isolieren und konstitutionell aufzuklären, um weitere Anhaltspunkte für die erwähnte spasmolytische Wirkung zu erhalten. Diese Untersuchungen sollten durch die Konstitutionsaufklärung eines bereits vor siebenunddreissig Jahren von M. BRIDEL und C. CHARAUX¹ isolierten Flavonglykosides aus *Centaurea jacea* ergänzt werden, da dieses Glykosid wegen seines offenbar sehr selten vorkommenden Substitutionstypes theoretische Bedeutung haben konnte.

¹ M. BRIDEL und C. CHARAUX, C.R. heb. Séances Acad. Sci. 833 (1922);
ibid. 1186 (1922)

B. Allgemeiner Teil

I. Strukturaufklärung von Centaurein

Im Jahre 1922 isolierten M. BRIDEL und C. CHARAUX¹ aus der Wurzelrinde von *Centaurea jacea* L. eine gelbe, kristalline Substanz vom Schmelzpunkt 150 bis 175°C, die zur Stoffgruppe der Flavone gerechnet wurde. Da bei der Hydrolyse Zucker und ein Aglykon erhalten wurden, musste ursprünglich ein Flavonglykosid vorgelegen haben.

Im Rahmen systematischer Untersuchungen in unserem Arbeitskreis beschäftigte sich W. KIRMAYER² erneut mit dieser Verbindung, wobei er im Verlauf seiner papierchromatographischen und orientierenden chemischen Vorversuche zu dem Schluss kam, dass sehr wahrscheinlich ein Polyhydroxymethoxy-flavon vorlag.

Bei der Nacharbeit stellte sich heraus, dass das Centaurein nicht nur in der Wurzel, sondern auch in den Blättern enthalten war, so dass wir zur Gewinnung grösserer Substanzmengen von getrocknetem Blattmaterial ausgehen konnten.

1. Isolierung

Die Isolierung folgte im Prinzip den klassischen Methoden der Substanzisolierung. Nach einer erschöpfenden Extraktion mit Methanol und Entfernung des Chlorophylls durch Heisswasserbehandlung und Ausschütteln mit Chloroform, liess sich die Hauptmenge des Centaureins mit Äthylazetat dem wässrigen Extrakt entziehen. Beim Einengen der Äthylazetat-Ausschüttelungen schied sich nach kurzem Stehen ein Kristallbrei ab, der nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Methanol-Wasser zu nadelförmigen gelben Kristallen führte, die bei 151°C schmolzen. Nach Angaben von M. BRIDEL und C. CHARAUX¹ liegt der Schmelzpunkt für Centaurein zwischen 150 und 175°C.

2. Identifizierung

a) Orientierende Vorversuche

Sowohl das Glykosid als auch das durch Salzsäurehydrolyse gewonnene Aglykon ergaben mit Magnesiumpulver in konzentrierter Salzsäure die für Flavone mit

¹ M. BRIDEL und C. CHARAUX, C.R. hebdomadaire des Séances Acad. Sci. 833 (1922);
ibid. 1186 (1922)

² W. KIRMAYER, Dissertation, München 1959

substituiertem C-3-Hydroxyl eine typische dunkelrote Reduktionsfarbe. Für die gleiche Gruppierung sprach der Reduktionstest mit Zink und Salzsäure nach M. SHIMIZU³. Hiernach hält die Färbung des Reduktionsproduktes 3 bis 4 Stunden an, wenn sich ein Zucker in C-3-Stellung befindet. In Übereinstimmung damit beobachteten wir sowohl beim Glykosid als auch beim Aglykon eine ungefähr 12 Stunden dauernde rote Färbung. Da auch das Aglykon auf diesen Test ansprach, war zu vermuten, dass die C-3-Stellung mit Methoxyl oder einem anderen Substituenten anstelle eines Zuckers besetzt war.

Über die Substitutionsverhältnisse im Seitenphenyl gab der Test nach L. HÖRHAMMER und K.H. MÜLLER⁴ den Hinweis, dass eine freie Hydroxylgruppe in 4'-Position vorhanden sein müsse.

Um über eine eventuelle C-5-Substitution Aufschluss zu erhalten, wurde der Zirkon-Zitronensäure-Test nach L. HÖRHAMMER und R. HÄNSEL⁵ durchgeführt. Dabei zeigten Glykosid und Aglykon auf Zusatz von Zirkonoxychlorid eine orangegelbe bzw. tief gelbe Färbung, die auf Zusatz von Zitronensäure erhalten blieb, bzw. nur geringfügig abgeschwächt wurde. Damit war die Anwesenheit eines freien C-5-Hydroxyls und einer besetzten C-3-OH-Gruppe wahrscheinlich.

Auf Zusatz von Eisenchlorid entstand beim Glykosid und Aglykon eine braune Färbung. Nachdem laut Angaben von L. H. BRIGGS und R.H. LOCKER⁶ nur Flavone mit 5,3- oder 8-Hydroxyl-Substitution, nicht jedoch solche mit Hydroxylsubstitution in Stellung 6, 7 oder 4' eine braune bis grüne Farbreaktion geben sollen, war ein weiterer Beweis für die Anwesenheit einer freien OH-Gruppe in C-5-Stellung geliefert.

Diese vorhergehenden Reaktionen standen in Widerspruch zu dem Löslichkeitsverhalten des Glykosids und Aglykons in konzentrierter Salzsäure. Während nämlich nach L. H. BRIGGS und R.H. LOCKER⁶ Flavone mit C-5-Hydroxyl in konzentrierter Salzsäure unlöslich sein sollen, konnten wir diese Beobachtung in unserem Falle nicht bestätigen.

³ M. SHIMIZU, J. pharmac. Soc. Japan 71, 1329 (1951)

⁴ L. HÖRHAMMER und K.H. MÜLLER, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 287/59, 376 (1954)

⁵ L. HÖRHAMMER und R. HÄNSEL, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 284/56, 276 (1951); *ibid.* 287/59, 310 (1954)

⁶ L. H. BRIGGS und R.H. LOCKER, J. chem. Soc. (London) 3136 (1951)

Geprüft wurde ausserdem auf eine Methylendioxygruppierung nach M. A. LABAT⁷ durch den Gallussäure-Test. Während Heliotropin sofort diese Reaktion ergab, war beim Glykosid und Aglykon auch unter variierten Versuchsbedingungen keine positive Reaktion zu erhalten.

Nach diesen orientierenden Farbreaktionen musste im Centaurein ein Flavonglykosid vorliegen, das in C-5- und C-4'-Stellung mit grosser Wahrscheinlichkeit eine freie OH-Gruppe und in C-3-Position vermutlich eine Methoxygruppe besitzen musste. Über die weiteren Substitutionsverhältnisse war damit noch keine weitere Aussage möglich.

b) Chemische Untersuchungen

Die Elementaranalyse ergab für das schmelzpunktne Centaurein 55.65% Kohlenstoff und 5.21% Wasserstoff. Die Methoxygruppenbestimmung nach Mikro-Zeisel brachte 18.36%. Diese Werte stimmen auf ein Trihydroxy-trimethoxy-monoglykosid im Bereich der Fehlergrenze annähernd überein (ber.: C = 55.17%, H = 4.98%, OCH₃ = 17.82%). Daraus folgt als Bruttoformel C₂₄H₂₆O₁₃.

Durch Hydrolyse mit 7proz. Salzsäure erhält man das Centaureidin vom Schmelzpunkt 97°C. Demgegenüber findet man bei M. BRIDEL und C. CHARAUX⁸ eine Schmelzpunktsangabe von 197°C. Da sich der Schmelzpunkt unserer Substanz auch nach mehrmaligem Umkristallisieren nicht änderte, muss dieser Unterschied auf einem Irrtum von Seiten der genannten Autoren resp. auf einem Druckfehler beruhen. Bei quantitativer Einwaage erhält man 70.45% Aglykon, was mit dem berechneten Wert von 69.0% gut übereinstimmt. Demnach liegt eindeutig ein Monoglykosid vor.

Zur Festlegung des Zuckeranteils wurde die Hydrolyselösung durch Dowex-II neutralisiert und aus der konzentrierten Zuckerlösung durch Zugabe von Phenylhydrazinhydrochlorid ein Osazon hergestellt, das mit einem Schmelzpunkt von 208°C mit dem von authentischem Glukoseosazon übereinstimmte.

Für das Centaureidin brachte die Elementaranalyse die Werte C = 57.87%, H = 4.83%, OCH₃ = 25.80%. Die für ein Trihydroxy-trimethoxy-flavon berechneten Werte sind: C = 60.00%, H = 4.44%, OCH₃ = 25.83%. Hieraus folgt die bereits von M. Bridel und C. Charaux referierte Bruttoformel C₁₈H₁₆O₈.

⁷ M. A. LABAT in Th. WEYL und J. HOUBEN, "Methoden der organischen Chemie", Bd. II, S. 421, Stuttgart 1953

⁸ M. BRIDEL und C. CHARAUX, C. R. hebdomadaire Séances Acad. Sci. 833 (1922); ibid. 1186 (1922); J. Pharmac. Chim. 27, 409 (1923); ibid. 28, 5 (1923)

Um die Zahl der freien phenolischen OH-Gruppen festzulegen, wurde mit Essigsäureanhydrid und wasserfreiem Natriumazetat azetyliert. Die bei 154°C schmelzenden Kristalle lieferten nach dem Verseifen 21.96% flüchtige Säure, woraus für das Produkt ein Triazetat folgt (ber. für ein Triazetyl-3-methoxy-flavon = 26.54%).

Zur Entmethylierung des Aglykons wurde mit Jodwasserstoffsäure, Phenol und Essigsäureanhydrid im Kohlendioxidstrom erhitzt. Man erhält dabei gelbe, seidige Nadeln vom Schmelzpunkt 300-302°C, der gut mit dem des 3.5.6.7.3'.4'-Hexahydroxyflavons (Quercetagetin, Smp. = 314-315°C⁹ und 300-305°C¹⁰) übereinstimmt. Dieselbe Übereinstimmung ergaben die Chromatographie im System Butanol-Eisessig-Wasser, in dem Quercetagetin und das entmethylierte Aglykon einen R_f-Wert von 0.45 aufwiesen, und die UV-spektrophotometrischen Messungen, die zu einem übereinstimmenden Kurvenverlauf und den bei 260 mμ und 363 mμ liegenden Maxima führten (siehe Experimenteller Teil, S. 34).

Zur weiteren Beweisführung wurde das entmethylierte Centaurein mit Essigsäureanhydrid und wasserfreiem Natriumazetat in das Quercetagetin-hexaazetat übergeführt und durch Schmelzpunkt und Azetylgruppenbestimmung mit dem in gleicher Weise aus authentischem Quercetagetin hergestellten Azetylprodukt verglichen (siehe Tab. 1).

Tabelle 1

	COCH ₃	Smp.
Hexaazetat des entmethy. Centaureidins	44.49%	191-196°C
Quercetagetin-hexaazetat	45.20%	209-210°C ¹¹

Des weiteren wurde das Aglykon mit Dimethylsulfat und Kaliumkarbonat total methyliert. Die bei 142°C schmelzenden Kristalle ergaben im Mischschmelzpunkt mit authentischem Hexamethyl-quercetagetin keine Depression¹². Ein Vergleich der UV-Spektren ergab gleichfalls volle Übereinstimmung (siehe Tab. 2).

⁹ G. KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse", Bd. II, S. 878, Wien 1932

¹⁰ Z. CEKAN und V. HEROUT, Chem. Listy 49, 1053 (1955)

¹¹ L. R. ROW und T. R. SESHADRI, Proc. Indian Acad. Sci. A23-24, 33 (1946)

¹² F. E. KING, T. J. KING und P. J. STOKES, ref.: C. A. 49, 14748 (1955)

Tabelle 2

Substanz	Max _I	Max _{II}
Methyliertes Aglykon	242 mp	335 mp
Hexamethyl-quercetagetin ^{1 3}	240 mp	335 mp

Auch der Vergleich der Methoxylgruppenbestimmungen ergab ein Hexamethyl-quercetagetin:

Methyliertes Aglykon	OCH ₃ = 46.13%
Hexamethylquercetagetin	OCH ₃ = 46.26%.

Auf Grund dieser Ergebnisse handelt es sich bei Centaurein um ein dreifach methoxyliertes Quercetagetin, in dem bekanntlich das 3.5.6.7.3'.4'-Hexahydroxy-flavon vorliegt (siehe Abb. 1, S. 6). Das IR-Spektrum des entmethylierten Centaureidins ist mit dem des Quercetagetins (siehe Abb. 6, S.13) in voller Übereinstimmung.

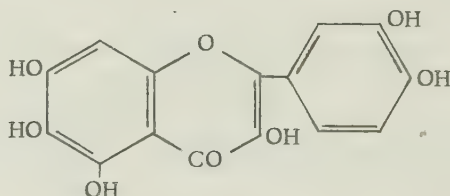


Abb. 1
Quercetagetin

c) Über die Stellung des Zuckerrestes

Man ermittelt die Lage der Zuckerverknüpfung durch Methylierung des Glykosides, anschließende Hydrolyse und Vergleich des erhaltenen Methylderivates mit bereits bekannten Literaturverbindungen. Die Methylierung des Glukosides mit Dimethylsulfat in wasserfreiem Azeton ergab nach Hydrolyse mit Mineralsäure ein farbloses kristallines Produkt, das bei 225-227°C schmolz. In der nachfolgenden Tabelle sind die Schmelzpunkte bekannter Monohydroxypentamethyläther des Quercetagetins zusammengestellt (siehe Tab. 3).

^{1 3} L. H. BRIGGS und R. H. LOCKER, J. chem. Soc. (London) 3136 (1951)

Tabelle 3

Nr.	Quercetageretin-methyläther		Schmelzpunkte
	Hydroxyl	Methoxyl	
1	3	3'.4'.5.6.7	234-235°C ¹⁴
2	5	3.3'.4'.6.7	161°C ¹⁵
3	6	3.3'.4'.5.7	209-210°C ¹⁶
4	7	3.3'.4'.5.6	234-235°C ¹⁷

Hiernach scheidet eine Zuckersubstitution am C-5 und am C-6 von vornherein aus. Eine C-3-Hydroxyl-Substitution war trotz des in der Nähe liegenden Schmelzpunktes nicht sehr wahrscheinlich, da nach Säurehydrolyse das Centaureidin immer noch ein besetztes C-3-Hydroxyl besass. Die C-5-Stellung war auf Grund der Farbreaktionen und auf Grund späterer Untersuchungen ebenfalls wenig wahrscheinlich. Somit blieb für die Verknüpfung nur noch C-6, C-7, C-3' und C-4' übrig. Wie die nachfolgende Alkalispaltung ergab, konnte auch eine mögliche Verknüpfung in C-3'-Stellung ausgeschlossen werden. Somit blieb noch zu entscheiden zwischen C-7 und C-4', wenn man berücksichtigt, dass eine C-6-Substitution bisher bei Flavonolen nicht bekannt geworden ist. Obwohl der 7-Hydroxy-3.3'.4'.5.6-pentamethyläther im Schmelzpunkt unserer Verbindung sehr ähnlich kam, war eine definitive Entscheidung wegen des Fehlens des analogen 4'-Hydroxy-3.5.6.7.3'-pentamethyläthers nicht möglich. Aus diesem Grund führten wir UV-spektrophotometrische Messungen mit dem Glykosid und dem Aglykon in Äthanol und in alkalischem Medium durch. Nach T. A. GEISSMAN¹⁸ verändert Apigenin sein Spektrum nicht, wenn es in C-7-Stellung verglykosidiert wird. Die gleiche Beobachtung machten L. HÖRHAMMER und Mitarbeiter¹⁹ bei Luteolin und Luteolin-7-glykosiden. Obwohl Centaurein bzw. Centaureidin Flavonolderivate sind, dürften hier beim Flavon ähnliche Verhältnisse vorliegen, da das C-3-Hydroxyl methoxyliert ist. Tatsächlich liegen die langwelligen

-
- ¹⁴ A. OLIVERO, G. B. MARINI-BETTOLO und G. BARGELLINI, Gazz. chim. ital. 78, 363 (1948)
- ¹⁵ P. SURYAPRAKASA-RAO, Proc. Indian Acad. Sci. 14A, 35 (1941)
- ¹⁶ L. RAMACHANDRA-ROW und T. R. SESHADRI, *ibid.* 23A, 23 (1946)
- ¹⁷ P. SURYAPRAKASA-RAO und T. R. SESHADRI, *ibid.* 14A, 289 (1941)
- ¹⁸ T. A. GEISSMAN, in K. PAECH und M. V. TRACEY "Moderne Methoden d. Pflanzenanalyse, Bd. III, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955
- ¹⁹ L. HÖRHAMMER, H. WAGNER und F. GLOGGENGIESSER, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 291/63, 126 (1958)

Maxima beim Glykosid und Aglykon übereinstimmend bei 355 m μ (siehe Tab. 4).

Tabelle 4

Substanz	Max _I	Max _{II}
Glykosid	259 m μ	355 m μ
Aglykon	257 m μ	355 m μ

Zur Sicherung dieser Ergebnisse führten wir auch Messungen nach den Angaben von G. H. MANSFIELD, T. SWAIN und C. G. NORDSTRÖM²⁰ in 0.002mol. Natriumäthylat-Lösung durch. Beim Vergleich der in Tabelle 5 für einige Flavone mit unterschiedlicher Substitution gegebenen Werte mit denen unseres Glykosides findet man eine gute Ähnlichkeit mit dem Verhalten eines Apigenin-5.7-dimethyläthers, was die Bande II betrifft.

Tabelle 5

Flavon	Max _I m μ in:			Max _{II} m μ in:		
	Äthanol	Natriumäthylat	Verschiebg.	Äthanol	Natriumäthylat	Verschiebg.
Apigenin-5.7-dimethyl	259	262	3	327	380	53
Centaurein	259	270	11	355	410	55
Apigenin	270	278	8	335	398	63
Centaureidin	257	275	18	355	422	67
Apigenin-5.4'-dimethyl	260	272	12	325	359	34
Apigenin-7.4'-dimethyl	271	292	21	325	-	-
Apigenin-7-glykosid	268	269	1	335	398	63
Apigenin-4'-glykosid	270	275	5	334	391	57

Da der Apigenin-5.4'-dimethyläther für sein zweites Maximum eine Verschiebung von nur 34 m μ zeigt, muss die Zuckerverknüpfung in C-7-Stellung sein. Das Centaureidin besitzt eine Verschiebung seines zweiten Maximums, wie sie auch für das Apigenin gefunden wurde. Dass diese Gesetzmässigkeiten nicht nur für Apigenin und seine Derivate allein gelten, bewiesen die Autoren durch Messungen auch an Luteolin und seinen Derivaten²¹. So findet man für den 3'.5.7-Trimethyläther des Luteolins im Natriumäthylat-Milieu eine Verschiebung der

²⁰ G. H. MANSFIELD, T. SWAIN und C. G. NORDSTRÖM, Nature (London) 172, 23 (1953)

²¹ C. G. NORDSTRÖM und T. SWAIN, J. chem. Soc. (London) 3, 2764 (1953)

ersten Maximums um 10 m μ und von 65 m μ für das zweite Maximum. Der Luteolin-3',5,4'-trimethyläther zeigt demgegenüber 27 m μ Verschiebung für das erste Maximum und 35 m μ für das zweite Maximum. Grössenordnungsmässig entspricht die Verschiebung unseres Glykosides dem ersten Substitutionstyp, obwohl zu berücksichtigen ist, dass eine Dihydroxygruppierung im Seitenphenyl einen etwas anderen Einfluss auf das Spektrum ausüben kann als eine 3'-Methoxy-4'-hydroxygruppierung.

Die Messungen haben wir noch durch die Aufnahme der Spektren von 4'-Hydroxy-tetramethoxy-quercetin und unserem methylierten und hydrolysierten Glykosid ergänzt (siehe Tab. 6). Hieraus geht ebenfalls eindeutig hervor, dass sich die Zuckerstellung am C-7 befinden muss.

Tabelle 6

Substanz	in Äthanol		in 0.002mol. Na-Äthylat		Verschiebung Max _{II} m μ
	Max _I m μ	Max _{II} m μ	Max _I m μ	Max _{II} m μ	
4'-OH-tetramethyl-quercetin	250	342	262	400	58
methyliertes und hydrolysiertes Glykosid	-	335	270	370	35

Vergleicht man die Ergebnisse, die man bei den UV-Messungen im alkalischen Milieu nach T. A. GEISSMAN und U. KRANEN-FIEDLER²² erhält mit denen von G. H. MANSFIELD, T. SWAIN und C. G. NORDSTRÖM²³, so ergibt sich insofern ein Widerspruch, als hier die Ionisierbarkeit der 7- und 4'-Hydroxyle für die jeweiligen Reaktionsmilieus gerade umgekehrt sein soll. So nimmt T. A. Geissman an, dass die C-7-OH-Gruppe am stärksten ionisiert wird und daher bei einem freien C-7-OH auch eine verhältnismässig starke bathochrome Verschiebung zufolge hat, während die 4'-OH-Gruppe weniger sauer reagiert und daher eine verhältnismässig geringe Bathochromie auslöst. In Natriumäthylat scheinen nunmehr die Verhältnisse so zu liegen, dass hier die 4'-Hydroxylgruppe stärker ionisiert wird als die C-7-OH-Gruppe. Da man im Endeffekt zu dem gleichen Ergebnis

²² T. A. GEISSMAN und U. KRANEN-FIEDLER, Naturwissenschaften 43, 226 (1956)

²³ G. H. MANSFIELD, T. SWAIN und C. G. NORDSTRÖM, Nature (London) 172, 23 (1953)

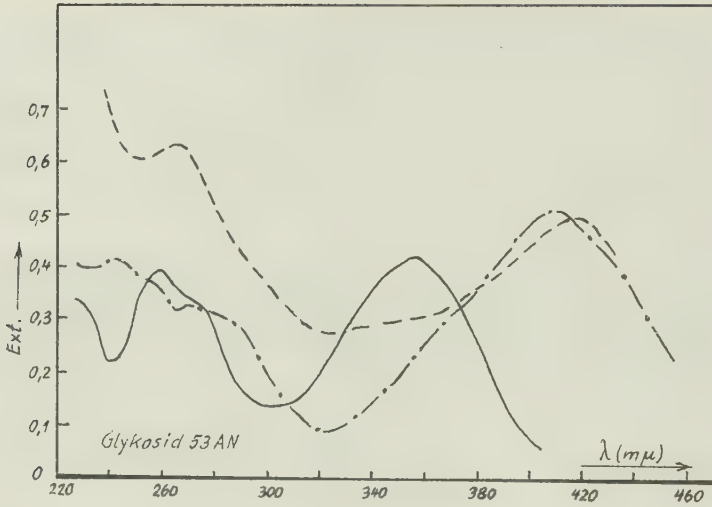


Abb. 2

UV-Spektrum des Centaureins aus *Centaurea jacea* L.
A = in Äthanol, B = in Natriumazetat, C = in Natriumäthylat

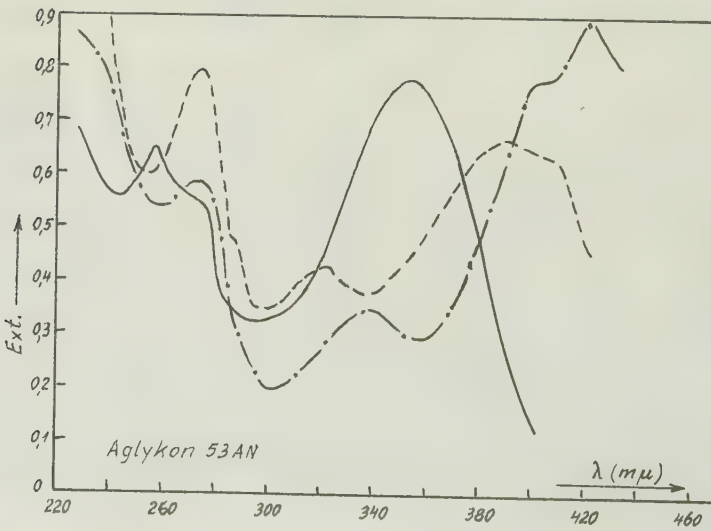


Abb. 3

UV-Spektrum des Centaureidins aus *Centaurea jacea* L.
A = in Äthanol, B = in Natriumazetat, C = in Natriumäthylat

kommt, ergibt sich hieraus als Folgerung, dass jeweils nur die im gleichen Medium gemessenen UV-Spektren miteinander verglichen werden dürfen.

d) Über die Substitution der OH-Gruppen

Um die Stellung der Methoxylgruppen festzulegen, wurden Glykosid und Aglykon dem Alkaliabbau unterworfen. Die Spaltung wurde vorgenommen einmal durch Schmelze in festem Alkali und zweitens durch Kochen mit 50proz. wässrigen Kaliumhydroxyd, da zu befürchten war, dass durch schärfere Alkalieinwirkung eine Entmethylierung eintrat. Tatsächlich erhielten wir im ersten Falle als Säureanteil Protokatechusäure, die wir durch seinen R_f -Wert und die Farbreaktion mit diazotierter Sulfanilsäure identifizierten. Nach dem zweiten Verfahren entstand eine Säure, die durch ihren Schmelzpunkt (Smp. 203-205°C) eindeutig als Vanillinsäure identifiziert wurde. Dadurch waren die Substitutionsverhältnisse im Seitenphenyl festgelegt. Die Methoxylgruppe musste sich in 3'-Stellung, die freie OH-Gruppe hingegen in 4'-Stellung befinden.

Trotz Variation der Versuchsbedingungen, Einwirkung von konzentrierter wässriger Kalilauge auf Glykosid und Aglykon bei Raumtemperatur oder Hydrolyse mit 7proz. methanolischer Kalilauge konnte ein phenolischer Anteil in keinem Falle erhalten werden, so dass damit über die Substitution im Chromongerüst keine Aussagen möglich waren.

Nachdem sich eine Methoxylgruppe im Seitenphenyl befindet und für die Zuckerstellung nur Position 7 in Frage kommt, konnten sich die restlichen zwei Methoxylgruppen nur in C-3-, C-5- oder C-6-Stellung befinden. Wie wir schon in früheren Versuchen zeigen konnten, ist das C-3-Hydroxyl substituiert, so dass schliesslich nur noch die beiden Möglichkeiten für C-5- und C-6-Position offen waren. Nach dem Zirkon-Zitronensäure-Test musste aber das C-5-Hydroxyl unsubstituiert sein, so dass am Ende nur noch das C-6-Hydroxyl für das fehlende Methoxyl in Frage kam. Es muss erwähnt werden, dass wir bei Behandlung mit Aluminiumchlorid weder beim Glykosid noch beim Aglykon eine starke Bathochromie fanden, die auf eine Komplexbildung hingedeutet hätte. Dieser Widerspruch dürfte aber, soweit die Versuchsbedingungen richtig gewählt wurden, auf den Einfluss des benachbarten Methoxyls zurückzuführen sein.

Eine Klärung in dieser Hinsicht war schliesslich durch Vergleich der IR-Spektren von Centaurein, dem methylierten und hydrolysierten Glykosid, dem von uns kürzlich aus *Linaria vulgaris* isolierten Pectolinarin²⁴ und dem Pentamethyl-

²⁴ W. KIRCHNER, Dissertation, München (in Vorbereitung)

quercetin möglich (siehe Abb. 4, 5, 7, 8). Bei unserem Glykosid wie auch bei Centaureidin und Pectolinarin liegt die CO-Bande bei 1665 cm^{-1} . Wären beide OH-Gruppen in Nachbarstellung zur Carbonylgruppe methyliert, wie dies im Pentamethylquercetin und im methylierten und hydrolysierten Glykosid der Fall ist, so müsste die Carbonylschwingung wesentlich längerwelliger, d.h. bei 1620 oder 1630 cm^{-1} liegen.

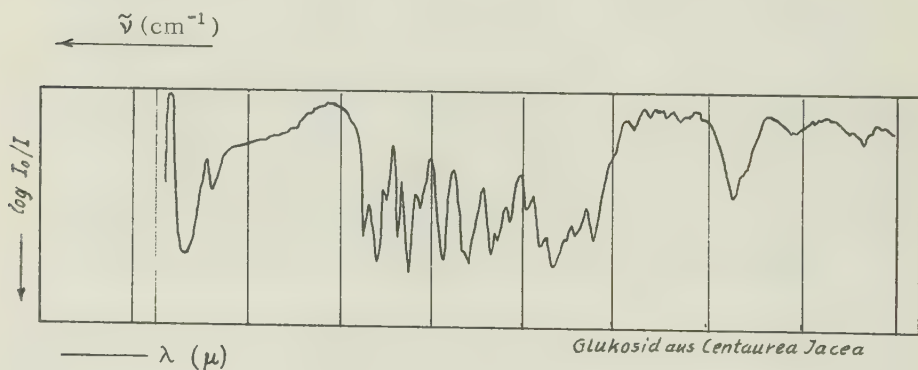


Abb. 4

IR-Spektrum von Centaurein. Konz. $2600\text{ g}/150\text{ mg KBr}$.

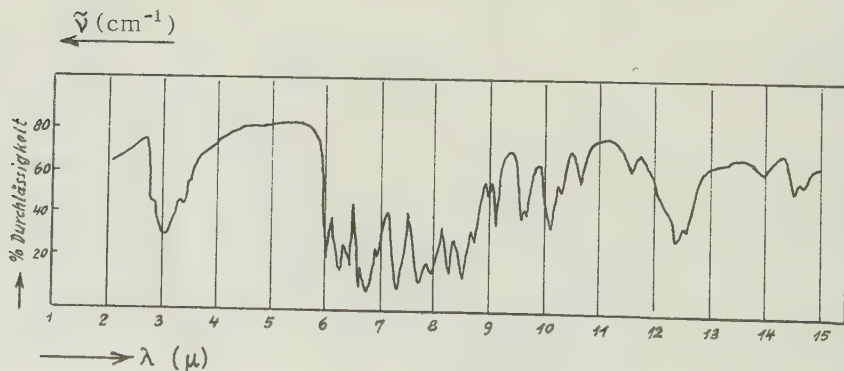


Abb. 5

IR-Spektrum von Centaureidin. Konz. $780\text{ g}/300\text{ mg KBr}$.

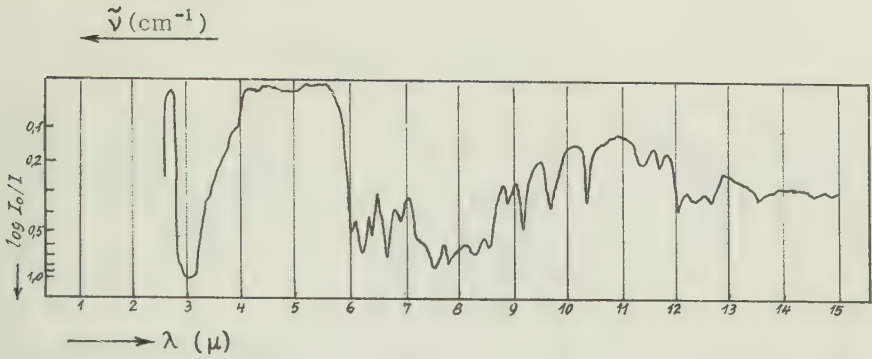


Abb. 6

IR-Spektrum von entmethyliertem Centaureidin. Konz. 730 γ / 300 mg KBr.

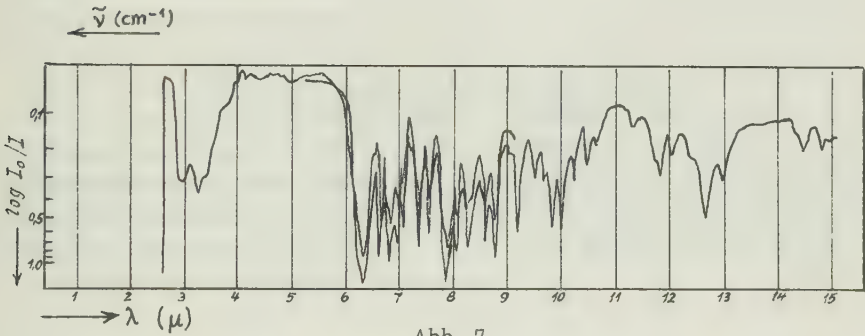


Abb. 7

IR-Spektrum von methyliertem und hydrolysiertem Centaurein.
Konz. 850 γ / 300 mg KBr.

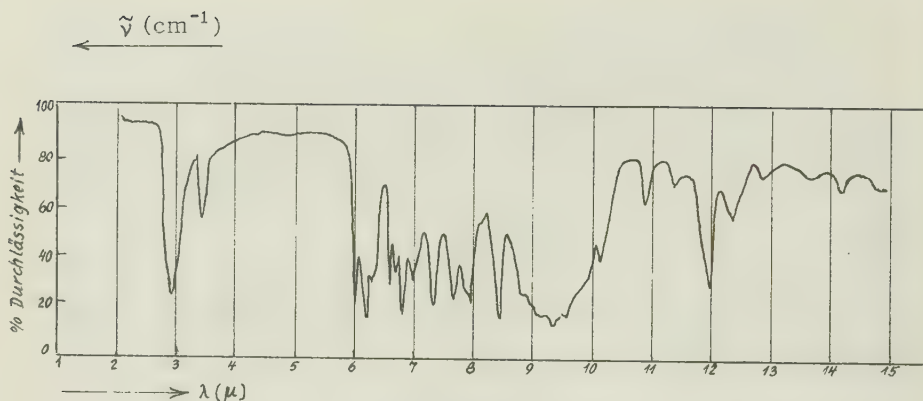


Abb. 8
IR-Spektrum von Pektolinarin

3. Diskussion der Ergebnisse

Für das Centaurein wurde als Grundstruktur das Quercetagetin ermittelt, in dem drei Methoxylgruppen in C-3-, C-6- und C-3'-Position substituiert sind. Für die Zuckerstellung konnte C-7 ermittelt werden. Demnach handelt es sich bei dem von M. BRIDEL und C. CHARAUX²⁵ isolierten Flavonglykosid um ein 7.5.4'-Trihydroxy-6.3.3'-trimethoxy-flavon-7-monoglykosid. Das gefundene Glykosid gehört in die bisher nur sehr selten vorkommenden Flavonolverbindungen mit einer OH-Substitution in Stellung 6, wie dies im Scutellarein und im Pectolinarin der Fall ist.

²⁵ M. BRIDEL und C. CHARAUX, C.R. hebdomadaire des Séances Acad. Sci. 833 (1922);
ibid. 1186 (1922)

II. Trennung und Identifizierung der Glykoside von Matricaria Chamomilla

Nach W. WIECHOWSKI und L. JUNKERMANN²⁶ enthalten die Blüten von *Matricaria Chamomilla* ein Glykosid, das "Darmbewegung dämpfende" Eigenschaften besitzt. Nachdem von F. B. POWER und J. H. BROWNING²⁷ sowie von W. LANG und K. SCHWANDT²⁸ und von M. MASCRE und R. PARIS²⁹ gefunden wurde, dass in den Blüten Apigenin bzw. die Glykoside davon vorkommen und erst kürzlich von F. SORM und Mitarbeitern³⁰ und I. JANKU³¹ gezeigt werden konnte, dass dem Apigenin deutliche spasmolytische Effekte zukommen, muss man annehmen; dass zumindest ein Teil der den Kamillenextrakten eigenen krampflösenden Wirkungen dieser Verbindung zukommt.

Da ausser dem von W. LANG und K. SCHWANDT²⁸ gefundenen Apigenin-7-glykosid und Quercetin-7-glykosid von W. KIRMAYER³² bei systematischen papierchromatographischen Untersuchungen in der Kompositenfamilie noch weitere Flavonderivate gefunden wurden, sollte im folgenden die Isolierung auch dieser Verbindungen einschliesslich des in seiner Struktur noch nicht genau festgelegten Apigenin-7-glykosids durchgeführt werden.

1. Papierchromatographische Voruntersuchungen

Getrocknete Scheibenblüten wurden mit reinem Methanol im Soxhlet extrahiert, der Methanolextrakt in der üblichen Weise von Chlorophyll befreit und der wässrige Rückstand mit Äthylazetat mehrmals ausgeschüttelt. Die vereinigten Äthylazetat-Ausschüttelungen kamen nach dem Eindampfen zur Trockne und Aufnahme in Methanol zur Chromatographie.

²⁶ W. WIECHOWSKI und L. JUNKERMANN, in: F. POULSSON "Lehrbuch der Pharmakologie", Leipzig 1937, S. 286

²⁷ F. B. POWER und J. H. BROWNING, J. chem. Soc. (London) 105, 2280 (1914)

²⁸ W. LANG und K. SCHWANDT, Dtsch. Apotheker-Ztg. 97, 149 (1957)

²⁹ M. MASCRE und R. PARIS, Bull. Sci. pharmacol. 43, 279 (1936);
ibid. 44, 401 (1937)

³⁰ F. SORM, Z. CEKAN, V. HEROUT und H. RASKOVA, Collect. Czechoslov. chem. Commun. 18, 130 (1953); Chem. Listy 46, 308 (1952)

³¹ I. JANKU, C. R. Séances Soc. Biol. 151, 241 (1957)

³² W. KIRMAYER, Dissertation, München 1959

Versucht wurden die Systeme Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5), Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10:2:3) und das Einphasensystem Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2:5:5), das von L. HÖRHAMMER und Mitarbeitern³³ für Aglykone entwickelt worden war. Die besten Trennungen erreichten wir mit diesem letzten Lösungsmittel. Der Gesamtextrakt lieferte insgesamt sechs Flecke, die mit steigendem R_f -Wert mit den Buchstaben A, B, C, D, E und F (siehe Abb. 9, S. 17) bezeichnet wurden. Wie sich im späteren Verlauf der Untersuchungen herausstellte, waren neben Fleck D noch zwei weitere Glykoside, die wir mit D_1 und D_2 bezeichneten, vorhanden. Die Scheibenblüten von *Matricaria Chamomilla* enthalten demnach acht Glykoside.

Zur näheren Kennzeichnung wurden die einzelnen Flecke mit Sprühreagenzien behandelt und auf Grund der hierbei auftretenden charakteristischen Farben näher gekennzeichnet.

Unter dem UV-Licht zeigten gelbe Fluoreszenz die Flecke C, D und E, so dass hier sehr wahrscheinlich Flavonole mit einer freien C-3-Hydroxylgruppe vorliegen. Die Flecke A, B und F erschienen mit bräunlichgelber bis rotbrauner Färbung, was für ein substituiertes C-3-Hydroxyl oder ein Flavon mit fehlendem C-3-Hydroxyl sprach.

Setzt man das Chromatogramm Ammoniakdämpfen aus, so liefern alle Flecke eine hellgelbe Färbung im Tageslicht. Nach T. A. GEISSMAN³⁴ spricht diese Fluoreszenzänderung für Flavonol-3-glykoside oder Flavone mit fehlender C-3-Substitution.

Beim Besprühen mit Aluminiumsulfatlösung zeigten die Substanzen C, D und E eine intensive gelbgrüne Fluoreszenz, so dass hier eindeutig Flavonole vorliegen.

Auf Zusatz von Bleiazetat führten die Flecken D, E und F zu gelben bis gelbgrünen Farbänderungen, was daraufhindeutet, dass diese Glykoside ein freies Hydroxyl im Seitenphenyl besitzen. Da die Flecken D_1 und C mit dem gleichen Reagens eine orange bis braunorange Farbvertiefung erfuhren, sind diese Verbindungen mit grösster Wahrscheinlichkeit durch eine freie o-Dihydroxygruppierung im Seitenphenyl charakterisiert.

Somit ergibt sich bereits aus der papierchromatographischen Übersicht folgende Zuordnung: A, B und F sind Flavone oder Flavonole mit besetzter C-3-OH-Gruppe,

³³ L. HÖRHAMMER, H. WAGNER und H. GÖTZ, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 291/63, 44 (1958)

³⁴ T. A. GEISSMAN in K. PAECH und M. V. TRACEY, "Modern Methods of Plantanalyses", Berlin 1955, Bd. III

C, D und E sind sehr wahrscheinlich Flavonole. Bei D, E, F und C ist mindestens eine OH-Gruppe im Seitenphenyl frei.

Eine weitere Zuordnung war nach Hydrolyse durch Charakterisierung der Aglykone möglich. Die Flecke wurden in absteigender Folge als A, B, C, D, D₂, E und F bezeichnet, wobei Fleck D mit dem Aglukon von D₁ überlagert war. Alle Flecke hatten im Vergleich zu den Glykosiden im IAW-System^{x)} niedrigere R_f-Werte.

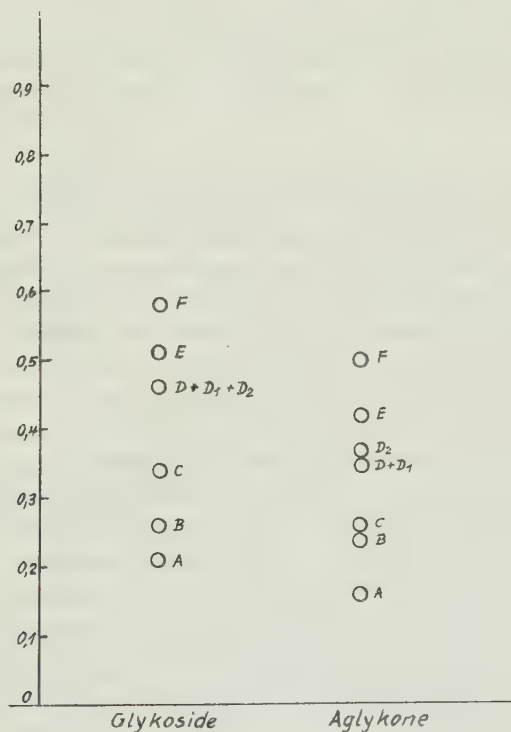


Abb. 9

Chromatogrammschema des Kamillenextraktes
vor und nach der Hydrolyse, mit IAW^{x)} entwickelt

^{x)} IAW = Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2:5:5)

Im BEW-System^{x)} dagegen hatten alle Flecke einen höheren R_f-Wert als die entsprechenden Glykoside. Dadurch wird bestätigt, dass im Gesamtextrakt keine freien Aglykone vorgelegen haben können. Ausserdem war aus den durch Sprühreagenzien entstandenen Färbungen zu ersehen, dass keine C-3-Glykoside vorhanden gewesen sein können, da anderenfalls unterschiedliche Fluoreszenzen in Erscheinung getreten wären. Im UV-Licht fluoreszierten C, D₁, D und E sehr stark, so dass es sich hierbei um Flavonole handelte, während A, B, D₂ und F dunkle Färbungen ergaben, was für eine fehlende C-3-Hydroxylgruppe oder eine besetzte C-3-Hydroxylgruppe typisch war. Nach Einwirkung von Ammoniakdämpfen wechselten alle Flecke in eine leuchtend gelbe Fluoreszenz. Mit Bleiazetat behandelt, wechselte D₂, das ursprünglich braun gefärbt war, seine Farbe nach Ocker.

2. Isolierung der einzelnen Glykoside

Um sämtliche Glykoside als Mischkristallizat zu erfassen, wurde versucht, aus Methanol zu kristallisieren bzw. durch Ausschütteln mit Äthylazetat eine Reinigung von Ballaststoffen zu erreichen. Diese Versuche blieben ebenso wie die selektive Bleiazetatmethode nach T. A. GEISSMAN³⁴ erfolglos. Anschliessend wandten wir uns der Säulenchromatographie zu und unternahmen zunächst einen Trennversuch auf Magnesolsäulen mit wassergesättigtem Äthylazetat als Eluiermittel. Dabei wurden Substanz A und B so stark absorbiert, dass diese Methode nicht in Frage kam. Ein weiterer Versuch mit dem erst kürzlich zur präparativen Auftrennung von Flavonen verwendeten Perlonpulver³⁵ zeigte wiederum keine besonderen Ergebnisse. Ein letzter Versuch, durch Säulenchromatographie eine weitgehende Auftrennung zu erreichen, wobei Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2:5:5) Verwendung fand, wurde mit einer Zellolosesäule unternommen. Dabei ergaben sich die ersten guten Trennergebnisse: Getrennt wurden die Glykoside A, B und F. Wie aus der nachfolgenden Übersicht hervorgeht, haben wir elf Fraktionen hergestellt, von denen die Fraktionen 3, 9 und 11 praktisch reine Verbindungen enthielten, während die übrigen noch Mischungen von zwei oder drei Glykosiden waren.

³⁴ T. A. GEISSMAN in: K. PAECH und M. V. TRACEY, "Modern Methods of Plantanalyses", Berlin 1955, Bd. III

³⁵ L. HÖRHAMMER, H. WAGNER und W. LEEB, Naturwissenschaften 44, 513 (1957)

^{x)} BEW = Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)

Trennübersicht

- | | |
|--|---------------------------|
| 1) Substanzen nicht flavonischer Natur | 6) D + D ₁ + C |
| 2) F + nicht näher untersuchte Begleitstoffe | 7) D + C |
| 3) F | 8) C + B |
| 4) F + E | 9) B |
| 5) E + D + D ₁ | 10) B + A |
| | 11) A |

In der Zwischenzeit wurde noch ein Versuch mit einer Gegenstromverteilung gemacht, der schliesslich der Vorzug gegeben wurde, da hiermit ohne weitere Vorreinigungen eine selektive Auftrennung erreicht werden konnte.

Die Brauchbarkeit der Gegenstromverteilung zur Auftrennung und Reinigung von Flavongemischen im Halbmikromastab wurde bereits von L. HÖRHAMMER und H. WAGNER ³⁶ bewiesen. Hiernach orientiert man sich zweckmässig nach den R_f-Werten, welche die zu trennenden Flavone im normalen Butanol-Eisessig-Wasser-System besitzen und benützt dann je nach Trennproblem die in der nachfolgenden Tabelle angegebenen Systeme und Stufenzahlen.

Tabelle 7

R _f zwischen	Lösungsmittelsystem			pH
0.00-0.40	Äthylazetat	Butanol	Wasser	
	15	5	20	
	16	4	20	
	17	3	20	
	18.5	1.5	20	
0.37-0.60	Äthylazetat	Wasser bzw. Phosphatpuffer		
	1 od. 1.5	1		5.5-6.5
0.50-0.70	Äthylazetat	Äther	Wasser	
	1	5	5	5.5-6.5
0.70-1.00	Äthylazetat	Heptan	Methanol	Wasser
	3	12	4	6
				6.00

³⁶ L. HÖRHAMMER und H. WAGNER, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 289/61, 532 (1956)

Auf Grund der zunächst zu trennenden Glykoside A und B wäre Lösungsmittelsystem I am geeignetsten gewesen. Da wir in Vorversuchen ermittelt hatten, dass sich Substanzen A und B in Äthylazetat mit 10% Methanolzusatz leicht lösen, während sie in reinem Äthylazetat praktisch unlöslich waren, wandelten wir dieses System dahingehend ab, dass wir das Butanol durch Methanol ersetzten. Nach einigen Vorversuchen schien sich Äthylazetat als Oberphase und 10proz. Methanol als Unterphase gut zu bewähren.

Wir verteilten über 200 Elemente, chromatographierten jedes Element und fassten zu zehn Fraktionen zusammen, wie dies aus nachstehender Tabelle hervorgeht.

Tabelle 8

Nummern der Elemente	enthaltene Substanzen
1) 1- 34	Begleitsubstanzen
2) 35- 53	A + D ₂
3) 54- 76	A + B
4) 77- 81	A + B + D ₁
5) 82-110	B + D ₁
6) 111-120	C + D ₁ + E + F
7) 121-133	C + D + E
8) 134-159	C + D + E + F
9) 160-180	F + D
10) 181-200	Begleitsubstanzen

Von diesen Fraktionen verwendeten wir nur Fraktion 2, 3, 5 und 9 zur weiteren Trennung.

3. Auftrennung der Fraktionen

- 1) Nachdem die Extraktion mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln zu keiner Trennung von A und D₂ führte, blieb nur noch die Craig-Verteilung oder die Säulenchromatographie. Wegen der geringen Menge an Mischkristallat war ein Erfolg von vornherein ziemlich aussichtslos, so dass wir uns den anderen Fraktionen zuwandten.
- 2) Um Glykosid A und B aus der dritten Fraktion zu trennen, wurde nach vergeblichen Versuchen mit Hilfe der Gegenstromverteilung die Chromatographie an einer Polyamidsäule mit Azeton als Eluiermittel eingesetzt, wobei es wenigstens teilweise gelang, reine Substanz A und reine Substanz B zu erhalten.

- 3) Substanzen B und D₁ aus Fraktion 5 liessen sich ebenfalls an einer Perlonsäule mit wasserfreiem Azeton als Eluiermittel auftrennen. Nach dem Umkristallisieren aus Methanol-Wasser erhielten wir ungefähr 15 mg D₁ und 8 mg B.
- 4) Aus Fraktion 9 konnten F und D an einer Perlonsäule mit Methanol als Eluiermittel und unter Verwendung eines Fraktionsteilers in geringen Anteilen getrennt werden. Da die beiden Verbindungen auf der Säule so dicht beieinanderliegende Zonen bildeten, gelang es nur, von F ein Kristallisat zu erhalten, während D nur in Lösung gewonnen werden konnte.

4. Identifizierung der einzelnen Glykoside

Glykosid F

Auf Grund von Farbreaktionen mit verschiedenen Sprühreagenzien und durch papierchromatographischen Vergleich mit vorhandenen Testsubstanzen konnte das Glykosid F als ein Apigenin-7-glykosid identifiziert werden. Der Schmelzpunkt betrug 208-210°C. Für ein Apigenin-7-glykosid werden von W. LANG und A. SCHWANDT³⁷ ein Schmelzpunkt von 240-242°C, von W. KIRMAYER³⁸ ein Schmelzpunkt von 194-196°C und von M. WADA und T. HATTORI³⁹ 219-220°C angegeben.

W. LANG und K. SCHWANDT³⁷ nahmen auf Grund des UV-spektrophotometrischen Verhaltens und verschiedener Farbreaktionen an, dass sich der Zuckerrest in C-7-Stellung befinden müsse. Auf chemischem Wege wurde dies jedoch bisher noch nicht bewiesen. Wir methylierten das Glykosid mit Dimethylsulfat in wasserfreiem Azeton, hydrolysierten das hierbei erhaltene Produkt und erhielten nach dem Umkristallisieren aus Methanol ein Kristallisat vom Schmelzpunkt 255-260°C, das im Schmelzpunkt mit dem in der Literatur für ein 7-Hydroxy-4',5-methoxy-apigenin vom Schmelzpunkt 265-267°C⁴⁰ annähernd übereinstimmt. Damit war eindeutig bewiesen, dass es sich bei Glykosid F um ein Apigenin-7-glykosid handelt.

³⁷ W. LANG und K. SCHWANDT, Dtsch. Apotheker-Ztg. 97, 149 (1957)

³⁸ W. KIRMAYER, Dissertation, München 1959

³⁹ M. WADA und T. HATTORI, Misc. Repts. Research Inst. Nat. Resources No. 32, 62-70 (1953)

⁴⁰ G. KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse", Teil II, Bd. III, S. 876, Wien 1932

Glykosid D₁

Glykosid D₁ zeigte einen Schmelzpunkt von 245-250°C. Durch Vergleich der Farbreaktionen und aus Analogieschlüssen könnten für dieses Glykosid das Quercetin-7-glykosid Quercimeritrin vom Schmelzpunkt 247-249°C⁴⁰, oder auch das Patuletin-7-glykosid (Patulitrin) vom Schmelzpunkt 253-254°C⁴¹ in Frage kommen. Wir verglichen daher die R_f-Werte von D₁ mit denen von Quercimeritrin und Patulitrin. Während sich auf Grund der mit verschiedenen Sprüthreagenzien auftretenden Farbreaktionen keine Unterschiede ergaben (siehe Tab. 10), wichen die R_f-Werte in verschiedenen Lösungsmittelsystemen bei D₁ vom Quercimeritrin ab und zeigten ungefähre Übereinstimmung mit Patulitrin (siehe Tab. 9).

Tabelle 9

Substanz	R _f -Werte in ^{x)}		
	BEW	IAW	ÄAW
Quercimeritrin ⁴²	0.31	0.32	0.35
D ₁ -Glykosid	0.43	0.45	0.43
Patulitrin ⁴²	0.36	0.42	0.355

Tabelle 10

Substanz	unbesprüht	mit Bleiazetat besprüht	mit Aluminiumsulfat besprüht
Quercimeritrin ⁴²	gelb	orange	gelbgrün
D ₁ -Glykosid	gelb	orange	gelbgrün
Patulitrin ⁴²	gelb	orange	gelbgrün

Beim Vergleich der CH-Werte (siehe Tab. 11) war eine weitere Entscheidung zugunsten des einen oder anderen Glykosides nicht möglich, da vor allen Dingen der Kohlenstoffwert des C₁-Glykosides erheblich tiefer lag als die für Quercimeritrin und Patulitrin berechneten. Den ersten Hinweis brachte allerdings die

⁴¹ N.R. BANNERJEE und T.R. SESHADRI, Proc. Indian Acad. Sci. 44, 284 (1956)

⁴² W. KIRMAYER, Dissertation, München 1959

^{x)} BEW = Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)
IAW = Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2:5:5)
ÄAW = Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10:2:3)

Methoxylgruppenbestimmung nach Mikro-Zeisel, die bei unserem D₁-Glykosid und bei Patulitrin auf eine Methoxylgruppe passte (Glykosid D₁ = 5.57%, Patulitrin = 6.2%).

Tabelle 11

Substanz	C %	H %	OCH ₃
Quercimeritrin ber.	54.31	4.31	-
D ₁ -Glykosid gef.	49.45	4.85	5.57
Patulitrin ber.	53.50	4.45	6.20

Da die UV-Spektren keine weiteren Charakterisierungsmöglichkeiten boten (siehe Tab. 12), wurde das Glykosid mit Salzsäure hydrolysiert, um das Aglykon von D₁ zu gewinnen.

Tabelle 12

Substanz	Max _I	Max _{II}
Quercimeritrin ⁴²	257 mμ	374 mμ
Di-glykosid	258 mμ	370 mμ
Patuletin ^{42 x)}	258 mμ	370 mμ

Der Schmelzpunkt der über Nacht auskristallisierten Verbindung lag bei 255 bis 260°C. Für Quercetin wird ein Schmelzpunkt von 312-316°C⁴³, für Patuletin von 260-261°C⁴⁴ bzw. 262-264°C⁴⁵ angegeben. Da die erhaltene Aglykonmenge für weitere Reinigung zu gering war und auch die R_f-Werte in verschiedenen Lösungsmittelsystemen keine neuen Gesichtspunkte ergaben, mussten allein die Methoxylgruppenbestimmung und das UV-spektrophotometrische Verhalten als Hauptbeweis für das Vorliegen von Patuletin-7-glykosid gelten.

^{x)} Das UV-Spektrum (Ergebnis der Spektralmessung) von Patulitrin war nicht verfügbar. Es ist jedoch bewiesen, dass die Maxima des 7-Glykosids und seines entsprechenden Aglykons dieselben sind. Wir verglichen daher die Messwerte von Patuletin anstelle von Patulitrin.

⁴² W. KIRMAYER, Dissertation, München 1959

⁴³ G. KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse", Teil II, Bd. III, S. 876, Wien 1932

⁴⁴ N.R. BANNERJEE und T.R. SESHADRI, Proc.Indian Acad.Sci. 44, 284 (1956)

⁴⁵ P.S. RAO und T.R. SESHADRI, Proc.Indian Acad.Sci. 14A, 643 (1941)

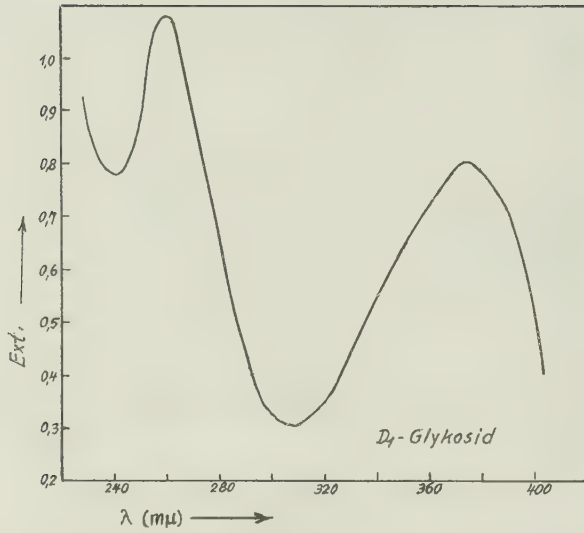


Abb. 10

UV-Spektrum von Glykosid D₁ aus *Matricaria Chamomilla* L. in Äthanol

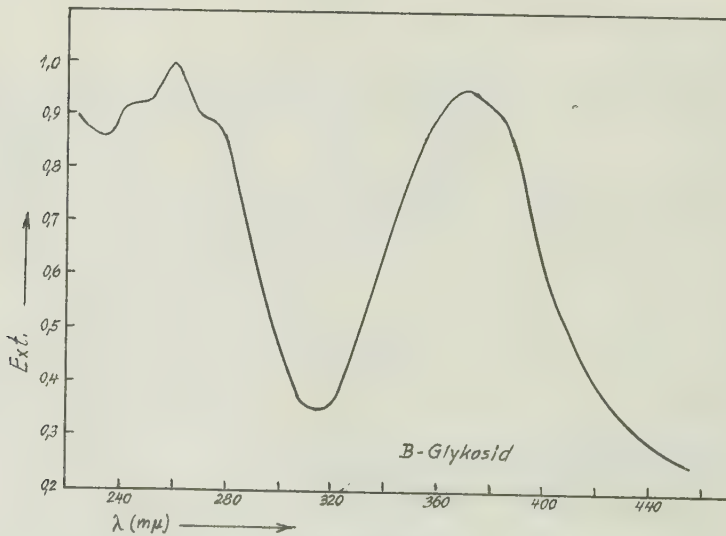


Abb. 11

UV-Spektrum von Glykosid B aus *Matricaria Chamomilla* L. in Äthanol

Einen letzten Beweis versuchten wir durch UV-spektrophotometrische Messungen in Natriumazetat-alkalischer und Natriumäthylat-alkalischer Lösung sowie auf Zusatz einer 5proz. Aluminiumchloridlösung zu erbringen.

In äthanolischer 0.002 m Natriumäthylatlösung zeigte das Glykosid eine bathochrome Verschiebung von 8 m μ für das erste und von 50 m μ für das zweite Maximum. Dies stimmt nach den Angaben von G.H. MANSFIELD, T. SWAIN und C.G. NORDSTRÖM⁴⁶ eindeutig mit einem 7-Glykosid überein.

Eine zusätzliche Messung wurde nach Zugabe von 5proz. Aluminiumchlorid durchgeführt, hierbei verschob sich das erste Maximum um 11 m μ , das zweite um 90 m μ . Dies zeigt an, dass sich sowohl in C-3-, in C-5- und in C-3'- und C-4'-Stellung OH-Gruppen befinden müssen.

Die UV-Spektren von Glykosid D₁ und Glykosid B sind in Abb. 10 und 11 (siehe Seite 24) dargestellt.

Im IR-Spektrum zeigte das Glykosid im Kurvenverlauf und in der Lage der einzelnen Schlüsselbanden grosse Ähnlichkeit mit dem des authentischen Patuletins. Die Lage der CO-Bande bei 1660 cm⁻¹ entspricht der eines im C-5- bzw. C-3-Hydroxyl substituierten Flavonkörpers. Auch die im Bereich zwischen 650 und 900 cm⁻¹ auftretenden fünf Banden bei 708, 755, 810, 852 und 880 cm⁻¹ lassen auf eine mehrfache Substitution im Seitenphenyl schliessen. Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit den bisher mitgeteilten Ergebnissen.

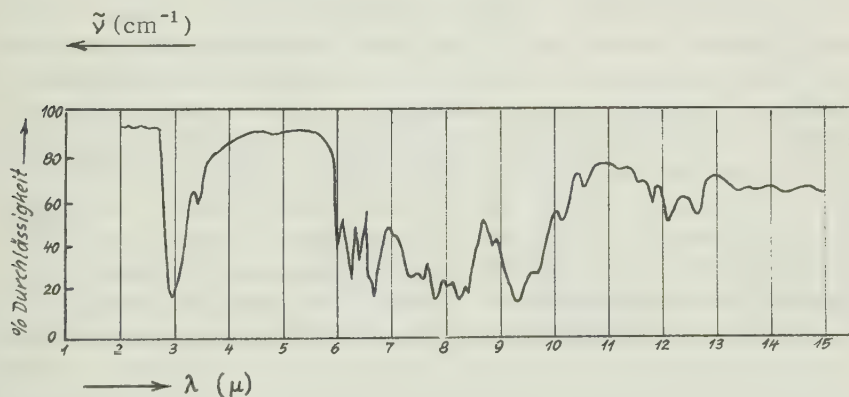


Abb. 12

IR-Spektrum von Glykosid B aus *Matricaria Chamomilla* L.

Konz. = 850 g / 300 mg KBr.

⁴⁶ G.H. MANSFIELD, T. SWAIN u. C.G. NORDSTRÖM, *Nature (London)* **172**, 23 (1953)

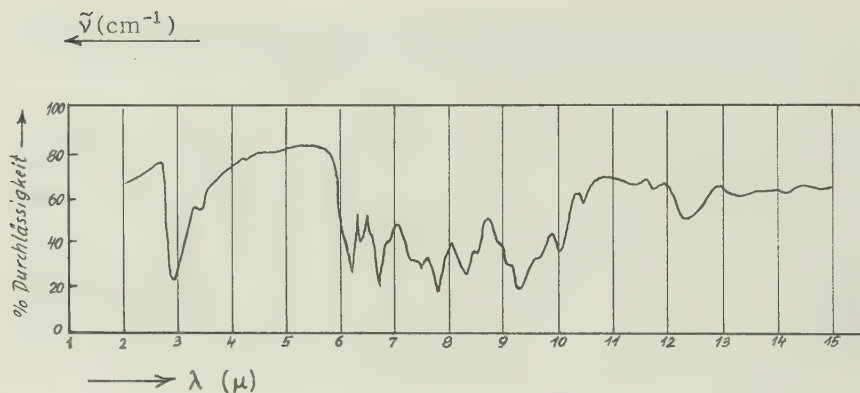


Abb. 13

IR-Spektrum von Glykosid D₁ aus *Matricaria Chamomilla* L.
Konz. = 740 γ / 300 mg KBr.

Glykosid B

Glykosid B lag in Form eines dunkelgelben Kristallisates mit einem Schmelzpunkt von 175-180°C vor. Eine Reinigung war wegen der geringen Substanzmenge nicht mehr möglich.

Auf dem Chromatogrammpapier lieferte Glykosid B einen im UV-Licht dunkelgelbbraun fluoreszierenden Fleck, der sich nach dem Besprühen mit Ammoniak tief gelb und mit basischem Bleiazetat dunkelbraun färbte. Wir hydrolysierten mit Salzsäure, erhielten jedoch keine Kristalle. Wir ätherten daher die saure Lösung aus und untersuchten das Aglykon papierchromatographisch und auf UV-spektrophotometrischem Wege. Unbesprüht erschien das Aglykon unter dem UV-Licht mit gelber Farbe, die nach Besprühen mit Aluminiumsulfat in eine gelbgrüne Färbung überging. Dieser Farbumschlag ist für ein Flavon mit freier C-3-Hydroxylgruppe charakteristisch. Mit Ammoniak reagierte die Substanz unter Gelbfärbung, ebenso auf Zusatz von Bleiazetat. Namentlich der Ausfall der letzten Farbreaktion deutet darauf hin, dass sich im Seitenphenyl höchstens eine freie OH-Gruppe befindet.

Das UV-Spektrum des Glykosids besitzt die beiden Maxima bei 260 und 365 mμ. Auf Zusatz von 5proz. Aluminiumchloridlösung wird das Maximum I um 19 mμ bathochrom verschoben, während das Maximum II seine Lage unverändert beibehält. Es entsteht also kein Aluminiumkomplex, so dass weder am C-5- noch am C-3 eine freie Hydroxylgruppe und auch sonst nirgends im Molekül eine freie Dihydroxygruppierung vorliegen kann.

In wasserfreiem Natriumazetat erleiden beide Maxima eine Verschiebung nach Rot um 20 m μ . In Natriumäthylatlösung (0.002m) wird das Maximum I um 15 m μ und Maximum II um 75 m μ bathochrom verschoben. Beide Messungen sind wohl nicht vergleichbar, doch darf aus den früheren Diskussionen gefolgert werden, dass eine Verschiebung um 75 m μ für das zweite Maximum auf eine freie 4'-Hydroxylgruppe und eine besetzte C-7-Hydroxylgruppe hinweist.

Das IR-Spektrum von Glykosid B ist dem des Patulitrins sehr ähnlich. Wenn daher eine Patuletin-ähnliche Grundstruktur vorliegt, muss sich dies nach eingehenden Studien von L. HÖRHAMMER und Mitarbeitern⁴⁷ im Bereich der γ -Schwingungen zwischen 650 und 900 cm⁻¹ kundtun. In unserem Falle waren zwei Banden bei 710 und 828 cm⁻¹ und eine stark hervortretende Bande bei 850 cm⁻¹ vorhanden. Obwohl diese Absorptionsfolge nicht eindeutig für eine Monosubstitution spricht, ist dies schon auf Grund der Farbreaktionen wahrscheinlich. Die Carbonylbande liegt bei 1670 cm⁻¹. Der R_f-Wert des Aglykons liegt zwischen dem des Quercetagetins und des Patuletins und zwar in allen drei von uns benutzten Systemen, das heisst also, dass unser Aglykon hydrophober als Quercetagetin und etwas hydrophiler als Patuletin ist. Einen neuen Gesichtspunkt brachte die Methoxylgruppenbestimmung nach Mikro-Zeisel, die einen Wert von 3.36% ergab. Dieser Wert liegt unter dem für eine Methoxylgruppe berechneten Wert, aber immerhin noch höher als die Prozentzahl, die man gelegentlich bei etwas verunreinigten Verbindungen findet. Es steht somit mit grosser Wahrscheinlichkeit fest, dass eine Methoxylgruppe im Molekül vorhanden ist. Versucht man, diesen Befund mit dem papierchromatographischen Verhalten in Einklang zu bringen, so käme ein Quercetagetin hierfür in Frage, das z. B. in C-3'-Stellung eine Methoxylgruppe besitzt.

Es handelt sich somit bei Glykosid B um ein neues Polyhydroxyflavon, das strukturell dem Quercetagetin bzw. dem Patuletin nahesteht.

Glukosid D

Wie bereits erwähnt, konnten wir diese Substanz nur in Lösung erhalten. Da sie nach den Untersuchungen von W. KIRMAYER⁴⁸ entweder Kämpferol- oder Iso-rhamnetinglykosid sein konnte, wurde mit Salzsäure hydrolysiert und chromatographiert. Dabei ergab ein Vergleich mit Testsubstanzen eine Identität mit Isorhamnetin. Damit in Übereinstimmung waren Farbreaktionen mit verschiedenen Sprühreagenzien.

⁴⁷ L. HÖRHAMMER, H. WAGNER und F. GLOGGENGIESSER, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 291/63, 126 (1958)

⁴⁸ W. KIRMAYER, Dissertation, München 1959

Glykosid D₂

Glykosid D₂ war in dem Gesamtextrakt nur in geringer Menge vorhanden und konnte daher ebenfalls nur in geringer Menge gewonnen werden. Nach der Hydrolyse fand sich papierchromatographisch ein einheitlicher brauner Fleck, der nach R_f-Wert und in seinem Verhalten gegenüber verschiedenen Sprühreagenzien Identität mit authentischem Luteolin zeigte. Wir nehmen daher an, dass es sich hierbei um ein Luteolinglykosid handelt, welches ebenfalls bisher noch nicht beschrieben worden war.

Glykosid A

Auch Glykosid A konnte nicht kristallisiert werden, sondern liess sich nur in unreinem Zustand für einige Reaktionen verwenden. Dem niedrigen R_f-Wert nach dürfte es sich bei dem Aglykon ebenfalls wieder um ein Polyhydroxyflavon handeln. Das Glykosid selbst hatte R_f-mässig und in seinem farbmässigen Verhalten eine grosse Ähnlichkeit mit einer Substanz, die von W. KIRMAYER⁴⁸ aus *Buphthalmum salicifolium* isoliert worden war. W. Kirmayer vermutete in diesem Glykosid damals ein Glykosid des Gossypetins.

⁴⁸ W. KIRMAYER, Dissertation, München 1959

C. Experimenteller Teil

1. Papierchromatographie

Für alle Untersuchungen verwendeten wir Papier der Firma Schleicher u. Schüll Nr. 2043b. Gearbeitet wurde nach der absteigenden Methode; die aufgetragene Menge betrug zwischen 50 und 100 μ . Zur Chromatographie der Glykoside, Aglukone und ihrer methylierten und entmethylierten Produkte kamen folgende Lösungsmittelsysteme zur Anwendung:

- I. Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)
- II. Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser (10:2:3)
- III. Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2:5:5)

Zum Sichtbarmachen der einzelnen Flecke wurden nachstehende Reagenzien benutzt:

- I. Basische Bleiazetat-Lösung DAB 6
- II. 5proz. methanolische Aluminiumsulfatlösung
- III. Ammoniakdämpfe.

Zum Nachweis der Zucker wurde Anilinphthalatlösung folgender Zusammensetzung verwendet: 1.63g Phthalsäure und 0.93g Anilin in 100 ml wassergesättigtem Butanol. Das getrocknete Zuckerchromatogramm wurde mit dieser Lösung besprüht und bei 110°C im Trockenschrank erhitzt. Wir betrachteten anschließend im sichtbaren und ultravioletten Licht.

Zum Nachweis der Spaltprodukte des Alkaliabbaus fanden die Lösungsmittel Verwendung:

- I. Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5)
- II. m-Cresol-Eisessig-Wasser (50:2:48)
- III. Benzol-Eisessig-Wasser (1:1:2)

und die Sprühreagenzien:

- I. 2proz. Eisen-III-chloridlösung
- II. diazotierte Sulphanilsäurelösung.

2. Zur Strukturaufklärung des Centaureins

a) Drogenmaterial

Das Pflanzenmaterial wurde auf Wiesen im Englischen Garten, München, im Sommer 1958 gesammelt, von Stengelteilen befreit und die Blätter in dünnen Schichten im Heizschrank bei 100°C getrocknet. Aus 750 g Frischmaterial wurden 250 g getrockneten Materials erhalten. Nach dem Pulverisieren wurde im Soxhlet mit ca. 1 l Methanol so lange extrahiert bis das Methanol farblos ablief. Anschliessend wurde vom Methanol abdestilliert und der verbliebene Rückstand in mehreren Anteilen kochenden Wassers aufgenommen und so lange digeriert bis sich der Hauptteil der wasserunlöslichen Verunreinigungen abgeschieden hatte. Man filtriert den wässrigen Extrakt, engt ihn auf ca. 100 ml ein und schüttelt ihn einige Male mit der gleichen Menge Chloroform bis die Chloroformschicht annähernd farblos ist. Anschliessend schüttelten wir den wässrigen Extrakt viermal mit gleichen Mengen wasserfreiem Äther aus. Es schloss sich die Äthylazetat-Ausschüttelung an, die mit ca. 3 l bis zur Erschöpfung des wässrigen Extraktes an Flavonoiden durchgeführt wurde. Nach dem Vertreiben des Äthylazetats wurde der Rückstand in 100 ml Methanol gelöst und stehengelassen. Nach 2 bis 3 Tagen hatte sich bei Raumtemperatur aus der methanolischen Lösung ein gelber Kristallbrei abgeschieden, der durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Methanol-Wasser weiter gereinigt wurde. Aus 250 g Ausgangsmaterial erhielt man 2.459 g eines gelben aus nadelförmigen Kristallen bestehenden Glykosids. Die Ausbeute betrug somit 9.8%.

b) Farbreaktionen

Reduktionstest:

Ungefähr 2-5 mg der Substanz wurden in 2 ml Methanol gelöst, 50 mg Magnesiumpulver hinzugefügt und die Lösung unter fliessendem kalten Wasser abgekühlt. Dann wird tropfenweise bis zu $\frac{1}{2}$ ml langsam konz. HCl hinzugefügt.

Zink-Salzsäure-Reduktionstest:

3-5 mg der Substanz wurden in 1 ml Methanol gelöst, 2 Tropfen konz. HCl hinzugefügt und gekühlt. Nach Zugabe von 20-25 mg Zinkpulver wurde 5 Minuten geschüttelt. Die Farbreaktion wurde nach 10 Minuten und nach 2-4 Stunden beobachtet.

Zirkon-Zitronensäure-Test:

2-5 mg der Substanz wurden in 10 ml Methanol gelöst, 1 ml 2proz. methanolische Zirkonoxychloridlösung hinzugegeben und die Farbe unter dem UV-Licht betrachtet.

Nach Hinzufügen von 1 ml 2proz. Zitronensäure wurde mit 20 ml destilliertem Wasser verdünnt. Wir beobachteten erneut die Farbe unter dem UV-Licht.

Test auf Methylen-dioxy-Gruppierung:

0.5 mg Substanz wurde in 1 ml konz. H_2SO_4 gelöst, 2 Tropfen 5proz. alkoholischer Gallussäurelösung hinzugefügt und die Farbreaktion sofort und nach 24 Std. betrachtet. Heliotropin und Piperonsäure wurden zum Vergleich herangezogen.

c) Spezielle experimentelle Befunde

Elementaranalyse von Centaurein:

4.628 mg Glykosid verloren bei der quantitativen Trocknung im Hochvakuum 0.376 mg Gewicht. Die verbleibenden 4.252 mg Substanz ergaben bei der Elementaranalyse 8.61 mg CO_2 und 1.98 mg H_2O .

$C_{24}H_{26}O_{13}$ (522)	gef.:	C = 55.65%	H = 5.21%
ber. f. Trimethoxy-trihydroxy- flavon-monoglukosid:		C = 55.17%	H = 4.98%

Methoxylgruppenbestimmung:

Bei 2.615 mg Einwaage verbrauchte die Substanz 4.64 ml n/50 $Na_2S_2O_3$.

$C_{24}H_{26}O_{13}$ (522)	gef.:	18.36% OCH_3
	ber.:	17.82% OCH_3

Quantitative Hydrolyse:

44 mg Glykosid wurden mit 10proz. Schwefelsäure 4 Std. unter Rückfluss auf dem Wasserbad erhitzt, anschliessend in Wasser gegeben und die entstandene Fällung abgenutscht. Nach Konstanttrocknung hinterblieben 31 mg Aglykon vom Schmelzpunkt $97^\circ C$ (Kofler-Schmelzpunkt unkorrt.).

Einwaage: 44 mg	gef.:	70.45% Aglykon
Auswaage: 31 mg	ber.:	69.00% Aglykon.

Elementaranalyse von Centaureidin:

Einwaage 4.353 mg; 9.23 mg CO_2 ; 1.88 mg H_2O .

$C_{18}H_{16}O_8$ (360)	gef.:	C = 57.87%	H = 4.83%
für Trimethoxy-trihydroxyflavon	ber.:	C = 60.00%	H = 4.44%

Methoxylgruppenbestimmung des Aglykons:

Einwaage: 2.110 mg; 5.26 ml Verbrauch n/50 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$ (360) gef.: 25.80% OCH_3
 ber.: 25.83% OCH_3

Entmethylierung des Centaureidins:

50 mg Aglykon, 3 ml Jodwasserstoffsäure, 0.5 ml Phenol und 0.5 ml Essigsäureanhydrid wurden auf einem Paraffinbad in einer Zweihalsmikroflasche 2 Std. lang bei 160°C in Kohlendioxidatmosphäre erhitzt. Anschliessend wurde von dem Präzipitat, das sich beim Abkühlen gebildet hatte, abfiltriert und aus Methanol-Wasser umkristallisiert. Es bildeten sich seidige gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 300-302°C (Kofler, uncorr.).

Totalmethylierung von Centaureidin:

50 mg Aglykon wurden in einem 250 ml Destillierkolben in 75 ml wasserfreiem Azeton gelöst. Dann wurden 2 g Kaliumkarbonat und 0.75 ml Dimethylsulfat hinzugefügt und 1 Stunde lang geschüttelt. Anschliessend wird 30 Stunden in einer Pilz-Heizhaube unter Rückfluss und aufgesetztem Calciumchloridrohr erhitzt. Nach Filtration des ausgeschiedenen Kaliumkarbonats wird Azeton abdestilliert und Wasser zugesetzt. Die sich abscheidenden Kristalle hatten einen Schmelzpunkt von 142°C.

Methoxylgruppenbestimmung des voll methylierten Centaureidins:

Einwaage: 4.398 mg; 19.60 ml Verbrauch n/50 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_8$ (402) gef.: 46.13% OCH_3
 ber.: 46.26% OCH_3

Azetylierung des entmethylierten Centaureidins:

20 mg der Substanz wurden mit 200 mg frisch geschmolzenem Natriumazetat und 2 ml Essigsäureanhydrid 4 Std. auf dem Wasserbad erhitzt, darauf in etwas kaltes Wasser gegossen und kräftig umgeschüttelt. Nach 12stündigem Stehen im Eisschrank schieden sich weisse Kristalle aus. Diese wurden umkristallisiert zu weissen, seidigen Nadeln, die bei 191-196°C schmolzen.

Einwaage: 4.160 mg; Verbrauch: 4.30 ml n/100 NaOH.

$\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$ (572) gef.: 44.49% CH_3CO
 ber.: 45.20% CH_3CO

Methylierung und Hydrolyse des Glykosids:

Das Glykosid wurde in analoger Weise wie unter Methylierung und Hydrolyse beschrieben, behandelt. Nach dem Umkristallisieren aus Methanol-Wasser wurden farblose Kristalle vom Schmelzpunkt 225-227°C erhalten (Kofler, unkorr.).

Alkalischmelze:

10 mg des Glykosids wurden mit 2 g geschmolzenem Kaliumhydroxyd 3 Minuten auf 200°C erhitzt. Nach dem Abkühlen der Schmelze wurde in destilliertem Wasser aufgenommen, die Lösung mit konzentrierter Salzsäure angesäuert (Lackmus-Papier) und mit Äther behandelt. Nach dem Vertreiben des Äthers lösten wir den Rückstand in wenig Methanol und verwendeten diese Lösung zur Chromatographie.

Alkalihydrolyse:

250 mg Glykosid wurden in 10 ml 50proz. wässriger Kaliumhydroxydlösung aufgenommen und 6 Std. am Rückfluss erhitzt. Dann wurde abgekühlt und mit destilliertem Wasser verdünnt. Wir säuerten mit konzentrierter Salzsäure an, extrahierten wie im Vorstehenden beschrieben mit Äther und verwendeten den mit Methanol aufgenommenen Rückstand zur Chromatographie.

Darstellung des Glukoseosazons:

0.5 ml Zuckerlösung, die nach Passage einer Dowex-II-Säule und anschliessender Konzentration erhalten wurde, gaben wir in ein Zentrifugenglas, fügten gleiche Mengen einer frisch bereiteten Phenylhydrazinhydrochloridlösung hinzu und kochten 1 Std. im siedenden Wasserbad bei aufgesetztem Steigrohr. Nach dem Abkühlen schieden sich Kristalle aus, die zentrifugiert und umkristallisiert wurden. Es entstanden gelbe Kristalle, die bei 208°C schmolzen (Kofler, unkorr.) und mit denen des authentischen Glukoseosazons übereinstimmten.

d) UV-Spektren

Alle Messungen wurden im Zeiss-Opton-Absorptions-Spektralphotometer Monochromator M4Q mit einer Quarzküvette von 1 cm Schichtdicke durchgeführt. Die Messungen in methanolischer bzw. alkalischer Lösung wurden in ca. $2 \cdot 10^{-4}$ -molarer Lösung durchgeführt.

Messung mit Natriumazetatlösung:

Die methanolische Lösung wurde 3 Minuten heftig mit frisch geschmolzenem Natriumazetat geschüttelt und 15 Minuten stengelassen. Die dekantierte Lösung wurde gemessen (Lösungen, die nicht ganz klar waren, wurden gefiltert).

5 ml der methanolischen Lösung und 5 ml des 0.004 m Natriumäthylats wurden gemischt und gemessen.

2 ml der alkoholischen Lösung wurden mit 2 ml alkoholgesättigter Borsäurelösung gemischt, mit Alkohol auf 10 ml verdünnt und mit einem Überschuss von wasserfreiem Natriumazetat geschüttelt. Nach 15 Minuten wurde in alkoholischer Lösung mit Aluminiumchlorid gemessen.

Tabelle 13

Centaurein

Lösungsmittel	Max _I	Max _{II}
Äthanol	259 mμ	355 mμ
Äthanol + Natriumazetat	266 mμ (320 mμ)	420 mμ
Äthanol + Natriumäthylat	242 mμ (270 mμ)	410 mμ
Äthanol + Borsäure + Natriumazetat	257 mμ	354 mμ
Äthanol + Aluminiumchlorid 5proz.	242 mμ (312 mμ)	363 mμ
Äthanol + Aluminiumchlorid 5proz. + Natriumazetat	268 mμ (312 mμ)	363 mμ

Tabelle 14

Centaureidin

Lösungsmittel	Max _I	Max _{II}
Äthanol	257 mμ	355 mμ
Äthanol + Natriumazetat	275 mμ (321 mμ)	390 mμ
Äthanol + Natriumäthylat	275 mμ (339 mμ)	422 mμ
Äthanol + Natriumazetat + Borsäure	273 mμ	365 mμ
Äthanol + Aluminiumchlorid 5proz.	241 mμ (302 mμ)	362 mμ

Entmethyliertes Centaureidin

Lösungsmittel: Max_I: Max_{II}:

Äthanol 260 mμ 365 mμ

Totalmethyliertes Centaureidin

Lösungsmittel: Max_I: Max_{II}:

Äthanol 242 mμ 335 mμ

Methyliertes und hydrolysiertes Glykosid:

Lösungsmittel	Max _I	Max _{II}
Äthanol	-	335 mμ
Äthanol + Natriumäthylat	270 mμ	370 mμ

e) IR-Spektren

Die Messungen erfolgten als KBr-Presslinge im Perkin-Elmer-IR-Spektrophotometer Nr. 21.

Centaurein	Konz.: 2600 γ / 150 mg KBr
Centaureidin	" 780 γ / 300 " "
entmethyliertes Centaureidin	" 730 γ / 300 " "
methyliertes und hydrolysiertes Centaurein	" 850 γ / 300 " "

Tabelle 15

Papierchromatographie

Substanz	R _f -Wert	Sprühreagens	Tageslicht	UV-Licht
Centaurein	BEW 0.64	-	-	dunkelbraun
	IAW 0.82	bas. Bleiazetat	-	schwarz-braun
	AAW 0.57	Aluminiumsulfat	-	orange
Centaureidin	BEW 0.88	-	-	dunkelbraun
	IAW 0.70	bas. Bleiazetat	-	schwarz-braun
		Aluminiumsulfat	-	gelborange
entmethyliertes Centaureidin		Ammoniak	gelb	gelb
	BEW 0.46	-	gelb	gelbbraun
	IAW 0.15	bas. Bleiazetat	orange gelb	ziegelrot
		Aluminiumsulfat	gelbbraun	leuchtend grün
		Ammoniak	leuchtend gelb	braunrot
		unbehandelt	Eisenchlorid	diazotierte Sulfanilsäure
Alkali-schmelzprodukt	BEW 0.82	grau	tief schwarz	blauschwarz
	CEW 0.37			
	BEW 0.85			
Protokatechusäure	CEW 0.35	grau	tief schwarz	blauschwarz
Alkali-schmelzprodukt	BEW 0.88	schwarz	braun	leuchtend orange
Vanillinsäure	BEW 0.92	schwarz	braun	leuchtend orange

3. Isolierung der Flavone von Matricaria Chamomilla

600 g Scheibenblüten, aus Flores Chamomillae DAB 6 des Handels^{x)} gewonnen, wurden mit 1,25 l Methanol im Soxhlet bis zum farblosen Ablauf des Methanols extrahiert. Der dunkelbraune methanolische Auszug wurde anschliessend vom Methanol befreit und der Rückstand in Anteilen mehrmals mit heissem destillierten Wasser digeriert. Hierzu wurden insgesamt 800 ml Wasser verwendet. Nach dem Abkühlen und längeren Stehen der wässrigen Lösung filtrierten wir und konzentrierten anschliessend im Vakuum auf 150 ml. Nun wurde mit Chloroform und anschliessend mit Äther in mehreren Portionen so lange geschüttelt, bis die Lösungsmittel völlig farblos waren. Nun erfolgte die Äthylazetat-Ausschüttelung, die in 5 Portionen mit insgesamt 2 l Lösungsmittel durchgeführt wurde. Bis auf die Glykoside A und B konnten damit alle Glykoside der wässrigen Lösung entzogen werden. Um auch Glykosid A und B zu extrahieren, wurde am Schluss mit ca. 1 l einer Mischung von Äthylazetat und 10% Methanol weiter extrahiert. Die Lösungsmittel wurden abgedampft, die Rückstände vereinigt und an der Luft getrocknet. Insgesamt wurden damit 6 g eines braunen Pulvers gewonnen. Für die papierchromatographischen Voruntersuchungen wurden geringe Mengen des Pulvers in Methanol gelöst und in den jeweiligen Systemen chromatographiert.

Tabelle 16

Fleck	R _F -Werte in IAW		Farbreaktionen im UV-Licht			
	Glykoside	Aglykone	unbehandelt	Al ₂ (SO ₄) ₃	bas. Bleiazetat	Ammoniak
A	0.21	0.16	erdbraun	purpurviolett	erdbraun	gelb
B	0.26	0.237	gelbbraun	gelbbraun	gelbbraun	gelb
C	0.34	0.26	gelb	orange	gelbgrün	gelb
D	0.46	0.35	gelb	gelborange	gelbgrün	gelb
		0.37 (D ₂)	braun	ocker	gelb	gelb
E	0.51	0.42	gelb	gelbgrün	gelbgrün	gelb
F	0.58	0.50	rotbraun	gelbgrün	gelb	gelb

a) Trennung der Glykoside durch Säulenchromatographie

500 g Zellulosepulver (Nr. 123a) der Firma Schleicher und Schüll wurden in kleinen Anteilen mit Isopropanol-Ameisensäure-Wasser-Gemisch in eine Säule von 1 m Länge und 6 cm Durchmesser eingeschlämmt. Um eine gleichmässige Verteilung zu erreichen, wurde die neue Portion erst dann zugegeben, wenn sich die

^{x)} von der Firma Caesar u. Loretz, Michelstadt/Odenw., bezogen

erste Füllung abgesetzt hatte. Das Lösungsmittel wurde durch Öffnen des Hahnes immer so weit entfernt, dass jeweils nur wenig davon in der abgesetzten Schicht verblieb. Vor jeder neuen Zellulosezugabe drückten wir die Zelluloseschicht vorsichtig mit einem Glasstab nach unten. Die Säulenfüllhöhe betrug am Schluss 80 cm. Nun wurde mit 1.5 l Isopropanol-Ameisensäure-Wasser gewaschen. Anschließend lösten wir 500 mg des Gesamtextraktes in etwa 10 ml Methanol, verrieben diese Lösung mit ca. 1 g Zellulosepulver, liessen das Lösungsmittel an der Luft abdunsten und brachten den fein verriebenen Rückstand in einer gleichmässigen Schicht auf die Säule. Die Schicht erhielt eine Watteauflage, die mit dem Glasstab leicht angedrückt wurde. Das Eluieren erfolgte mit dem Isopropanol-Ameisensäure-Wasser-Gemisch mit insgesamt 7 l über einen Zeitraum von 8 Tagen. An Hand der im UV-Licht sichtbaren Zonen unterteilten wir in insgesamt 10 Fraktionen. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum abgedampft und nach Lösen in geringen Mengen Methanol zur Chromatographie verwendet.

b) Auftrennung durch Gegenstromverteilung

Ca. 6 g des Gesamtextraktes wurden in der Unterphase des Systems Äthylazetat-Wasser-Methanol(10%) gelöst, filtriert und in das erste Verteilungsgefäss eingefüllt. Die Äquilibration erfolgte durch 30maliges Schütteln. Die Verteilung ging über 200 Elemente. Jeweils 2 Elemente wurden zusammengefasst, im Vakuum eingedampft und nach Aufnahme in Methanol chromatographiert. Nach dem chromatographischen Bild (siehe Abb. 14, S. 38) unterteilten wir in insgesamt 8 Fraktionen (siehe Tab. 17, S. 37).

Tabelle 17

Elemente	Substanzen
1- 34	Begleitsubstanzen
35- 53	A + D ₂
54- 76	A + B
77- 81	A + B + D ₁
82-110	B + D ₁
111-120	C + D ₁ + E + F
121-133	C + D + E
134-159	C + D + E + F
160-180	F + D
181-200	Begleitsubstanzen

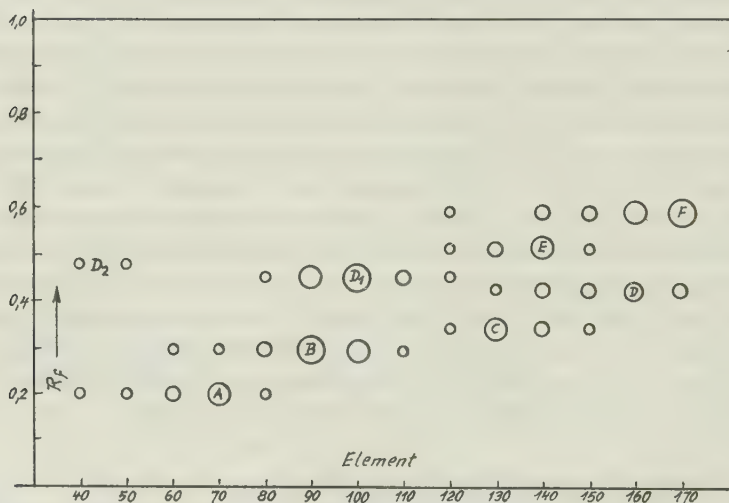


Abb. 14
Schematische Auftrennung des Gesamtextraktes
durch Gegenstromverteilung

c) Chromatographie an Polyamid^{x)}

- α) Der Rückstand der Fraktionen B + D₁ wurde in wenig Azeton aufgenommen und auf eine Perionsäule von 30 cm Höhe gegeben. Das Eluieren erfolgte mit insgesamt 800 ml reinem Azeton. Das Wandern der Zonen wurde unter dem UV-Licht verfolgt und die Vorlage gewechselt, nachdem die erste Zone völlig eluiert war. Zunächst erhielten wir das Glykosid D₁, von dem nach dem Eindampfen und Auskristallisieren ca. 15 mg gewonnen werden konnten. Glykosid B folgte dicht auf die erste Zone und lieferte insgesamt 8 mg Reinsubstanz.
- β) Für die Trennung der Glykoside F und D wurde eine Polyamidsäule von 4.5 cm Durchmesser und 140 g Polyamidpulverinhalt verwendet. Das Einschlämmen erfolgte mit Methanol. Bevor die Glykosidlösung auf die Säule gegeben wurde, war mit reinem Methanol mehrere Stunden gewaschen worden. Der Fraktionsrückstand wurde mit 5 ml Methanol aufgenommen, auf die Säule gegeben und mit insgesamt 900 ml Methanol eluiert. Die Unterteilung des Eluates erfolgte mit dem Fraktionssammler der Firma Bender und Hobein, München, in 100 Gläser mit je 5-6 ml Fassungsvermögen (siehe Tab. 18 und Abb. 15, S. 39).

^{x)} Polyamidpulver BM₁ der Firma B. A. S. F., Ludwigshafen/Rh.

Tabelle 18

Elemente	Substanz
0-20	F
25-45	F + D
50-80	D

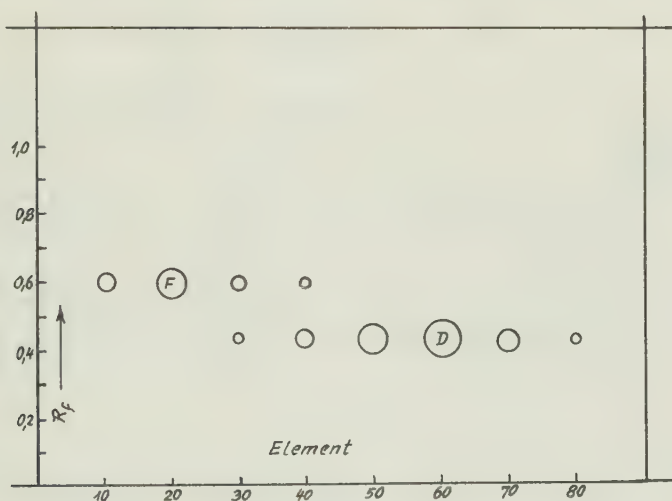


Abb. 15

Schematische Auftrennung der Glykoside F und D
an einer Polyamidsäule

d) Chemisches, physikalisches und papierchromatographisches Verhalten der isolierten Glykoside

Glykosid D₁ :

Die Hydrolyse wurde mit 10 mg Glykosid und 10 ml 10proz. Schwefelsäure durchgeführt. Nach Zugabe von Wasser erhielten wir einige Milligramm Aglykon, die einen Schmelzpunkt von 260°C aufwiesen. Die R_f-Werte und Farbreaktionen mit verschiedenen Sprühreagenzien sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich.

Tabelle 19

Aglykon D₁

R _f -Wert in	Sprühreagenzien	Farben im UV-Licht
BEW 0.771	unbesprüht	leuchtend gelb
IAW 0.28	bas. Bleiazetat	orange
ÄAW 0.86	Aluminiumsulfat	gelbgrün

Die R_f-Werte des Glykosids betragen in BEW = 0.43,
IAW = 0.45 und in
ÄAW = 0.43.

Tabelle 20

UV-Spektrum

Substanz gemessen in:	Max _I	Max _{II}
Äthanol	258 mμ	370 mμ
Natriumazetat	290 mμ	385 mμ
Natriumäthylat 0.002m	266 mμ	420 mμ
Al(Cl ₃) ₂ 5proz.	275 mμ	460 mμ

Glykosid B:

Glykosid B ist eine gelbe, kristalline Substanz mit dem Schmelzpunkt 175-180°C.

Tabelle 21

Glykosid B

R _f -Wert in	Sprühreagenzien	Farben im UV-Licht
BEW 0.26	unbesprüht	gelbbraun
IAW 0.30	bas. Bleiazetat	erdbraun
ÄAW 0.31	Aluminiumsulfat	grünbraun

Hydrolysiert wurde mit 5 ml Lösung und 5 ml 20proz. Schwefelsäure über 3 Stunden.

Tabelle 22

UV-Spektrum des Glykosids

Substanz gemessen in:	Max _I	Max _{II}
Methanol	265 mμ	365 mμ
Natriumazetat	280 mμ	390 mμ
Natriumäthylat 0.002 m	275 mμ	440 mμ
Aluminiumchlorid 5proz.	241 mμ	365 mμ (305 mμ) ^{x)}

Tabelle 23

Methoxylgruppenbestimmung

Substanz	Einwaage mg	n/50 Na ₂ S ₂ O ₃ ml	OCH ₃ %
Glykosid B	0.185	0.06	3.36

Glykosid D:

Wir hydrolysierten 2 ml der Lösung mit 2 ml 20proz. Schwefelsäure wiederum 3 Stunden. Nach Eingiessen in Wasser war kein Kristalliat zu erhalten.

Tabelle 24

R_f-Werte

Substanz	BEW	IAW	ÄAW
Glykosid D	0.50	0.44	0.65
Aglykon D	0.75	0.35	0.85
Isorhamnetin	0.72 ^{x)}	0.28 ^{x)}	0.88

Tabelle 25

Farbreaktionen

Substanz	unbesprüht	mit bas. Bleiazetat	m. Aluminiumsulfat
Aglykon D	gelb	gelb	grüngelb
Isorhamnetin	gelb	gelb	grüngelb

^{x)} inflexion

^{x)} nach W. PROBST, Dissertation, München 1958

Glykosid D₂:

Glykosid D₂ konnte nicht in reiner Form isoliert werden. Es war immer mit etwas Glykosid A verunreinigt. Die Hydrolyse der Mischlösung wurde mit 2 ml 20proz. Schwefelsäure durch 3stündiges Erhitzen durchgeführt.

Tabelle 26

R_f-Werte

Substanz	BEW	IAW	ÄAW
Aglykon D ₂	0,85	0,37	0,86
Luteolin	0,88	0,33	0,858

Tabelle 27

Farbreaktionen

Substanz	unbesprüht	bas. Bleiazetat	Aluminiumsulfat
Aglykon D ₂	dunkelbraun	ocker	gelb
Luteolin	dunkelbraun	ocker	gelb

Glykosid A:

Tabelle 28

R _f -Wert in	Sprühreagenzien	im UV-Licht
BEW 0,21	unbesprüht	gelbbraun
IAW 0,20	bas. Bleiazetat	ziegelrot
ÄAW 0,20	Aluminiumsulfat	grünbraun

e) IR-Spektren

Die Messungen erfolgten mit KBr-Presslingen im Perkin-Elmer-IR-Spektrophotometer Nr. 21.

Glykosid B Konzentration: 850 γ / 300 mg KBr

Glykosid D₁ Konzentration: 740 γ / 300 mg KBr.

f) UV-Spektrophotometrie

Die UV-Spektren wurden wie auf Seite 33 angegeben im Zeiss-Spektralphotometer mit 1 cm Quarzküvetten durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei den gleichen Molaritäten.

Lebenslauf

Am 7. Dezember 1930 wurde ich, Krishnakant M. Parikh, als Sohn des Kaufmannes Mathurades Parikh und seiner Ehefrau Shantagauri, geb. Parikh, im Bombay geboren.

Nach elfjährigem Schulbesuch legte ich 1949 die Abschlussprüfung (Matriculation Examination) in Bombay ab. Anschliessend studierte ich an der Universität Bombay vier Semester Naturwissenschaften und bestand 1951 das Zwischenexamen (Intermediate Science Examination). Dann nahm ich am L.M. College of Pharmacy in Ahmedabad mein Pharmaziestudium auf, das ich im Oktober 1953 mit der Abschlussprüfung beendete.

Von 1953 ab arbeitete ich vier Jahre lang als wissenschaftlicher Mitarbeiter in den "Zandu Pharmaceutical Works Ltd." in Bombay.

Im Oktober 1957 kam ich nach Deutschland und arbeitete zunächst drei Wochen im Kontroll-Laboratorium der Firma Merck in Darmstadt.

Am 1. November 1957 begann ich am Institut für Pharmazeutische Arzneimittel-lehre der Universität München unter Leitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer mit der Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation.

